

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 01 N 27/327			G 01 N 27/30	3 5 3 B
C 12 M 1/34			C 12 M 1/34	E
C 12 Q 1/00	6807-4B	6807-4B	C 12 Q 1/00	B
1/26			1/26	
G 01 N 27/416			G 01 N 27/30	3 5 3 R
		審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 9 頁)		最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-82332

(22)出願日 平成7年(1995)4月7日

(71)出願人 000141897

株式会社京都第一科学

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

(72)発明者 浜本 勝美

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

(72)発明者 奥田 久

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

株式会社京都第一科学内

(74)代理人 弁理士 青山 葵 (外2名)

(54)【発明の名称】 センサ、その製造方法およびセンサを使用する測定方法

(57)【要約】

【目的】 血液中の乳酸濃度を高精度で測定でき、コストの低いセンサを提供する。

【構成】 絶縁性基板上に形成された測定極と対極とかなる電極の上に試薬層が設けられており、試薬層が、親水性高分子からなる親水性高分子層と、乳酸オキシダーゼおよび電子伝達体からなる反応層とから構成された乳酸センサにおいて、反応層がリン酸塩およびアルキレンオキサイド系ポリマーを更に含有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 絶縁性基板上に形成された測定極と対極とからなる電極の上に試薬層が設けられており、試薬層が、親水性高分子を含んで成る親水性高分子層、ならびにオキシダーゼ系酵素および電子伝達体を含んで成る反応層とから構成されており、酵素により酸化される物質を含んで成る液体中のそのような物質の含量を測定するセンサにおいて、反応層がリン酸塩を更に含んで成ることを特徴とするセンサ。

【請求項2】 酵素が乳酸オキシダーゼであり、液体中の乳酸濃度を測定するための請求項1のセンサ。

【請求項3】 親水性高分子は精製されたものである請求項1または2記載のセンサ。

【請求項4】 親水性高分子層および反応層の少なくとも一方がアルキレンオキサイド系のポリマーを更に含む請求項1～3のいずれかに記載のセンサ。

【請求項5】 絶縁性基板上に測定極および対極から成る電極を形成し、親水性高分子を含んで成る溶液を電極に適用した後に乾燥して電極の少なくとも一部分を親水性高分子層により被覆し、オキシダーゼ系酵素、電子伝達体およびリン酸塩を含んで成る、反応層を構成する組成物を含んで成る溶液を親水性高分子層に適用した後に乾燥して親水性高分子層少なくとも一部分を反応層により被覆することを特徴とする請求項1記載のセンサの製造方法。

【請求項6】 酵素が乳酸オキシダーゼである請求項5記載の製造方法。

【請求項7】 親水性高分子は精製されたものである請求項5または6記載の製造方法。

【請求項8】 反応層を構成する組成物を含んで成る溶液中のリン酸塩の濃度が0.01重量%～1.00重量%の範囲である請求項5～7のいずれかに記載の製造方法。

【請求項9】 親水性高分子層用を含んで成る溶液および反応層を構成する組成物を含んで成る溶液の少なくとも一方がアルキレンオキサイド系のポリマーを更に含む請求項5～8のいずれかに記載の製造方法。

【請求項10】 アルキレンオキサイド系ポリマーの溶液中の濃度が、0.01重量%～1.00重量%の範囲である請求項9記載の製造方法。

【請求項11】 請求項2～3のいずれかに記載のセンサを使用することを特徴とする血液中の乳酸濃度の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、極微量の体液のような液体、例えば血液（全血）、血漿、尿および唾液中、特に血液を用いてその中の特定の成分、例えば乳酸、グルコース、コレステロール等の濃度を簡便かつ迅速に精度

良く測定することができるセンサ、例えば乳酸センサ、その製造方法および液体中の特定の成分の濃度の測定方法に関する。

【0002】

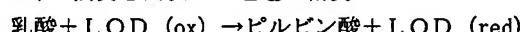
【従来の技術】 血液中の乳酸濃度を試験紙により測定する場合に使用する組成物として、乳酸測定用組成物が特公昭第58-4557号公報に記載されている。ここでは、支持体の上に乳酸オキシダーゼ（LOD）、パーオキシダーゼおよび発色試薬を含む試薬層が設けられ、乳酸濃度に応じて変化する反射率を測定することにより乳酸濃度を測定することが記載されている。また、特公平5-79319号公報では、試薬層に乳酸デヒドロゲナーゼ、ニコチニアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）、電子伝達物質、テトラゾリウム塩を含有する組成物が提案されている。

【0003】 これらの特許公報はいずれも支持体の上に設けた展開層に血液に含浸させた後に試薬層に浸透させ、乳酸との反応の結果として生じる呈色反応を光学的手段で検出するものである。しかし、展開層および試薬層に親水性の多孔性部材を用いているため、簡易測定法としては比較的多量（20ul）の血液量が必要であり、血液量が不足すると、発色むらが生じて測定精度を悪化させたり、測定不可能になったりすることがあった。

【0004】 一方、酵素電極を用いて乳酸濃度を定量する方法が特開平第6-94672号公報に記載されている。ここでは、絶縁性基板上に形成した測定極と対極からなる電極上に親水性高分子、LOD、電子伝達物質を含む試薬層を形成し、スペーサーとカバーを貼り付けたセンサが使用されている。このセンサの電極は小型であるため、液量が極微量（例えば5μl）でも測定可能であり、血液を毛管現象により自動的に吸引するため、電極上にむらなく血液が展開される。そのため、測定ミスが生じることもなくなっている。

【0005】 上述のような電子伝達体を用いた酵素電極を使用する測定原理は、例えば乳酸の濃度を測定する場合、次のようにある：基質S（濃度を測定すべき成分、例えば乳酸）が酵素E（例えば乳酸オキシダーゼ）によって生成物P（例えばピルビン酸）へ酸化されると、酵素Eの活性中心が酸化型E（ox）から還元型E（red）に変化する。還元型E（red）は、酵素の電子伝達体として働く酸化型の化合物M（ox）を介してE（ox）に戻り、電子伝達媒体はM（red）となる。同時に作用極上で適当な印加電圧によってM（red）は電解され、この時に得られる酸化電流を測定することにより基質濃度が測定できる。

【0006】 この測定原理を式にて示すと、乳酸オキシダーゼ（LOD）を用いて乳酸濃度を測定する場合は、



(1)



このような酵素電極を使用する測定方法は、J. R. M or and R. Guanacciaのアナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.)、第79号、第319頁 (1977年) に記載されており、本発明においてもこれを参照できる。

【0007】このようなセンサを使用する場合、全血、血漿、尿、唾液等の液体サンプルは、センサのサンプル吸入口に接することにより、毛管現象によって自動的に試薬層に吸引され始め、それにつれて、排気口から空気が排出されて試薬層の全体にサンプルが満たされる。サンプルの吸引が終わると直ちに試薬層の溶解が始まり、式(1)に従って酵素反応が進行する。

【0008】電子伝達体Mとしてはフェロセン、フェリシアン化カリウム、ベンゾキノン等が用いられ、式(2)で生成した還元型のM(red)は、外部電源による印加回路から電極系に0.3～0.6Vの範囲の一定電圧を印加することによって式(3)で示すように電解酸化を受ける。この時に得られる電流値(e⁻)は、乳酸濃度に直接比例するので、この電流値を測定することによりサンプル中の乳酸濃度が得られる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】上述のセンサは、従来の特開平第3-54447号公報等に記載のグルコースセンサの技術を殆どそのまま応用したものであるが、酵素電極に特有の問題点があり、更に、乳酸の濃度測定の場合には別の問題点もある。最初に、親水性高分子中に含まれる不純物とオキシダーゼ系酵素との相互作用によって測定時のバックグラウンド電流が増加するということである。例えば血液中の乳酸濃度はグルコースに比べて1/10程度であるので、バックグラウンド電流が増加すると乳酸の濃度が低い場合の測定の精度が大きく影響を受ける。

【0010】また、乳酸の濃度測定のためのセンサの場合には、特にコストの問題が顕著となる。即ち、グルコースセンサに用いられているグルコースオキシダーゼ(GOD)に比べて本発明のLODはユニット当たりの単価が100倍程度も高いため、同一のセンサにより測定できる範囲を広くしようとすると、多くの量の酵素をセンサに含ませることが必要となり、従って、センサのコストが高くなってしまう。そのため、コストの面からは、使用するLODは必要最小限とする必要がある。ところが、試薬層が乾燥によって剥離してその一部が失われることがあり、コストを考慮して、LODの量を最小限とした場合では、LODの量が不足するという結果となり、測定結果の再現性が悪くなる原因となっていた。他のオキシダーゼ系酵素を使用する場合であっても、LODの場合ほど顕著ではないが、同様の問題が生じる。

【0011】更に、上述のような試薬層の剥離を抑える

目的で乾燥剤を入れない高湿度条件でセンサを保存すると、剥離は確かに防止される。しかしながら、試薬層中の残留水分の影響によりバックグラウンド電流が徐々に増加するため、保存安定性が悪くなるといった問題が新たに生じる。そこで、試薬層中の水分を直ちに取り除いた上で剥離耐性のある試薬層を形成する必要があった。従って、上述のような問題点に鑑み、本発明が解決しようとする課題は、液体サンプル中の被測定物質の含量(例えば濃度)を高精度で測定できるセンサを低いコストで製造することである。

【0012】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するため、本発明では絶縁性基板上に形成された測定極と対極とからなる電極の少なくとも一部分の上に試薬層が設けられ、その試薬層は親水性高分子層およびオキシダーゼ系酵素を含む反応層から構成され、また、好ましくは試薬層は親水性高分子層の上に形成した反応層により構成される、液体中(例えば血液中)の酵素により酸化される物質(例えば乳酸)の含量を測定するセンサ(例えば乳酸センサ)において、試薬層に関して以下のように改良した:

(1) 反応層にリン酸塩を添加することにより、オキシダーゼ系酵素の活性を増加させ、その結果、少ないオキシダーゼ系酵素量でも活性が不足せず、高い被測定物質濃度(例えば乳酸)領域まで直線性が得られるようにする;

(2) 純度の高い親水性高分子を用いる、例えば市販の親水性高分子を更に精製することにより、親水性高分子中に含まれる不純物の量を減らすことによってバックグラウンド電流を減少させて測定精度が向上するようにする; また

(3) アルキレンオキサイド系の高分子を試薬層および/または親水性高分子層に更に添加することにより試薬層の剥離を防止する。

【0013】従って、第1の要旨において、本発明は、絶縁性基板上に形成された測定極と対極とからなる電極の上に試薬層が設けられており、試薬層が、親水性高分子を含んで成る親水性高分子層、ならびにオキシダーゼ系酵素(例えば乳酸オキシダーゼ、LOD)および電子伝達体を含んで成る反応層とから構成されており、オキシダーゼ系酵素により酸化される物質を含んで成る液体中のそのような物質の含量(特に濃度)を測定するセンサ(例えば乳酸センサ)において、反応層がリン酸塩を更に含んで成ることを特徴とするセンサ(例えば乳酸センサ)を提供する。

【0014】尚、本発明において、試薬層は原則として親水性高分子層および反応層の2つの層から構成されるが、この層は、厳密な意味で2層に分離している必要は

必ずしもなく、場合により、特に製造方法によっては、2層が混合した状態となっている場合も含まれるものと理解されたい。本発明において、測定極とは、上述のように電子伝達媒体が酸化または還元される電極、即ち、被測定物質の含量測定に役割を果す極を意味し、対極とは測定極に対する極を意味するものとして使用している。

【0015】本発明において、オキシダーゼ系酵素とは、生体物質を酸化する反応を触媒する酵素であり、酸化酵素（オキシダーゼ）、脱水素酵素（デヒドロゲナーゼ）、酸素添加酵素（オキシゲナーゼ）等がこれに含まれる。具体的には乳酸オキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ウリカーゼ、アルコールオキシダーゼ、NADHオキシダーゼ、ジアホラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ等を例示できる。また、本発明において、オキシダーゼ系酵素により酸化される物質とは含量を測定すべき物質、即ち、被測定物質であり、乳酸オキシダーゼの場合は乳酸であり、グルコースオキシダーゼの場合はグルコースであり、コレステロールオキシダーゼの場合はコレステロールである。本発明において、被測定物質は液体中に溶解していても、あるいは分散していてもよい。また、液体とは、そのような被測定物質が溶解または分散するものであれば特に限定されるものではなく、例えば、水、エチルアルコールであってよい。従って、被測定物質を含んで成る液体とは、例えば血液、尿、血漿および唾液のような体液であってよい。

【0016】本発明のセンサ、センサの製造方法およびセンサを使用する含量、特に濃度（溶液状態の場合）の測定方法を、乳酸オキシダーゼをオキシダーゼ系酵素として使用する場合を例として、以下に説明するが、そのような本発明は、他のオキシダーゼ系酵素、例えばグルコースオキシダーゼおよびコレステロールオキシダーゼにも同様に適用できる。即ち、実質的には、以下の詳細な説明において、乳酸オキシダーゼを他の酵素に、また、測定される物質を当該他の酵素により酸化される物質に置き換えるべき。

【0017】本発明の乳酸センサを構成するために使用できる電極材料は、一般的に電極として使用され得る材料であればいずれの材料であってもよい。具体的には、炭素、金属、合金、金属および合金の種々の化合物（例えば酸化物、水酸化物、ハロゲン化物、硫化物、窒化物、炭化物）などを挙げることができる。更に、これらの電極材料の混合物および複合体のような組み合わせも使用できる。本発明において、混合物とは、電極材料がいわゆるミクロオーダーで混合しているものを意味し、複合体とは電極材料が混合物より大きいオーダーで混合しているもの（従って、いわゆるマクロオーダーで混合して、混合物ほど均一に混合していないもの）および別個の材料として組み合わせたものを意味する。

【0018】好ましい金属としては、例えば銀、アルミニウム、金、コバルト、バリウム、鉄、マンガン、ニッケル、鉛、亜鉛、白金、リチウム、銅などを挙げることができる。好ましい合金としては、白銅、マンガニン、アルミニウム-ケイ素合金、ニッケル-銅合金などを例示できる。特に好ましい金属の化合物としては、MnO₂、Ag₂O、PbO₂、NiOOH、SOCl₂、V₂O₅、AgClなどを例示できる。

【0019】また、炭素を用いる場合、グラファイト、熱分解炭素、グラッシャーカーボン、アセチレンブラック、カーボンブラックの種々の炭素材料を使用することができる。勿論、通常の無定型の炭素材料を使用することも可能である。混合物または複合体として電極材料を使用する場合、MnO₂とアセチレンブラック、白金とグラファイト、銀と塩化銀などの組み合わせを例示できる。

【0020】本発明の乳酸センサにおいて、電極の構造は特に限定されるものではなく、従来のグルコース測定用の酵素電極などにおいて採用されている種々の構造を採用することができる。電極は、例えば線状、ロッド状、面状の形態であってよく、これらの電極は、電流値を測定するために適当な回路（例えば電流測定回路）に接続されるようになっている。本発明の特に好ましい態様では、電極の構造として薄層構造を採用できる（例えば図1を参照）。

【0021】このような電極は、薄層電極を形成する常套の方法により製造できる。即ち、電極を形成する材料の適当な寸法の粉末と適当なバインダー（例えばポリ塩化ビニル、エポキシ、ネオプレン、セルローズなど）および適当な溶媒（例えばテトラヒドロフラン、トルエン、イソプロピルアルコールなど）ならびに必要な場合には導電性材料（例えば炭素粉末、導電性ポリマーなど）を混合して電極材料ペーストを調製し、このペーストを基板材料（例えばストリップ状ポリエチレンテレフタート、セラミック基板など）上に適当な方法（例えばスクリーン印刷法など）により適当な厚さ（例えば10～200μm）に配置し、その後、乾燥することにより、好ましくは焼結することにより厚さが1～50μmの薄層電極を形成できる。

【0022】また、必要に応じて上記の薄層電極を2層以上重ねて形成してもよい。更に、場合により、基板材料上に、例えば銀ペーストを電極と同様な方法でリードとして予め形成し、その上に上述のように電極を形成してもよい。このように、電極と基板との間にリードを設けると、より電気抵抗の小さいリード部分を電流が流れやすくなるため、電気抵抗が低くなり印加電圧のロスが少なくなる、という効果がある。

【0023】本発明の乳酸センサにおいて、上述のような電極のそれぞれの少なくとも一部分の上に設ける、好ましくは全部の上に設けて電極を完全に被覆するように

する。より好ましくは、单一の試薬層により双方の電極が完全に被覆されるように試薬層を設ける。この試薬層は、親水性高分子層および反応層から構成され、いずれの層が電極に接触していてもよく、あるいは、双方の層が明確な境界面により隔てられているのではなく、双方が境界面近傍において混合した状態、あるいは、全体として混合した状態であってもよい。特に好ましい態様では、最初に親水性高分子層を設け、その上に、反応層を設ける。

【0024】親水性高分子層は、センサの保存時においては、試薬層に含まれる化合物を電極上に保持するバインダーとして機能し、(電極と反応層との間に位置する場合では)電極と反応層との間のセパレーターとして、あるいは試料(例えば血液)の吸引を円滑にするという機能を果たす薄層である。この親水性高分子層は、親水性高分子を含んで成る。本発明において、親水性高分子とは、親水性の置換基を有するモノマーが重合した水溶性の高分子である。具体的には、親水性高分子として、例えばカルボキシメチルセルロース(CMC)を用いるのが特に好ましいが、特にこれに限定されるものではなく、その他の類似のポリマーを用いても良い。例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロースを使用できる。また、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールなどを使用することもできる。場合により親水性高分子層はホスファチジルコリン等の界面活性作用を有する物質を追加的に含んでもよい。この親水性高分子層は、測定極および対極の双方の電極の少なくとも一部分、好ましくは全部を覆うように適用する。これは、親水性高分子の水溶液を電極に塗布し、乾燥することにより適用する。親水性高分子層は、例えば厚さ10~100μm程度のものであってよい。

【0025】本発明の乳酸センサにおいて、使用する親水性高分子は、特に高純度であるものが好ましく、例えば純度が99.9重量%以上であるものが好ましい。高純度のものが入手できない場合には、例えば揮発性が高く、かつ親水性高分子が溶解しない有機溶媒(例えばアセトン、テトラヒドロフラン、メチルアルコール等)に親水性高分子の水溶液を混入することにより、有機溶媒に溶解する不純物を除去し、さらに再結晶した水溶性高分子のみを取り出して乾燥することにより精製するのが好ましい。市販されている親水性高分子、例えばCMCは、純度が99重量%以下(不純物はレドックス化合物、空気中のゴミ、雑菌、油脂類など)であり、これを精製して、99.9重量%以上、特に99.9重量%以上の純度として本発明において使用するのが好ましい。例えば、第一工業製薬から市販されているパオゲンEPの場合、不純物量としては、CMC合成時の酸化還元化合物や製造時の雑菌、塵埃、油分が少なくとも0.1%程度混入している。本発明において、上述のように高純度の親水性高分子を使用すると、バックグラウンド

電流が小さくなり、測定精度が向上する。

【0026】本発明の乳酸センサにおいて、試薬層を構成する反応層は乳酸オキシダーゼ(LOD)、電子伝達体およびリン酸塩を含んで成り、これらが相互に均一に混合された固体の相として、好ましくは固相化された薄層として対極および測定極の双方の少なくとも一部分の上に、従って、親水性高分子層が独立した層として存在する場合は、親水性高分子層の少なくとも一部分の上に存在する。このような薄層は、親水性高分子層も反応層も上述の電極の形成の場合と同様な方法で行うことができる。例えば、酵素、電子伝達体、バインダーおよび溶媒(例えば水、エタノール、好ましくは水)を含んで成る試薬ペーストを調製し、これを適当な方法(例えば分注機による方法)で電極を被覆するように電極上に配置した後、乾燥することにより固相化する。

【0027】本発明の乳酸センサにおいて、電子伝達体として使用できる材料としては、従来からいわゆる酵素電極などに使用されているものはいずれでも使用でき、例えばフェリシアン化カリウム、ベンゾキノン、フェナジンメトサルフェート、チオニン、フェロセン、ナフトキノン、メチレンブルー、メトキシPMS、メルドラブルーなどを用いることができる。また、本発明の乳酸センサにおいて、反応層に使用するリン酸塩は、水に溶解してイオン化し、アルカリ性を示す塩であり、例えば、リン酸水素二カリウムを使用するのが好ましいがこれに限定されるものではない。そのほかのリン酸塩として例えば、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸カルシウム、リン酸マグネシウムなどを用いることができる。これらのリン酸塩は、LODの活性を高め、測定精度を向上させる。

【0028】更に、本発明の乳酸センサにおいて、反応層を構成する成分にエステル結合が主体のポリマー、特にアルキレンオキサイド系のポリマーであって、アルキレンオキサイド(例えばエチレンオキサイド、プロピレンオキサイド、ステレンオキサイド、ブチレンオキサイドなど)の付加重合体が、多価カルボン酸(例えばマロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、タル酸、テトラベンゼンカルボン酸など)またはその誘導体(例えば無水コハク酸、無水マレイン酸などの無水物あるいは、タル酸ジメチル、マレイン酸ジメチルなどの低級アルキルエステルなど)とエステル化反応もしくはエステル交換反応することによりポリマーとなつものであり、分子量が2万~30万であるポリマーを更に加えると、再現性の良い乳酸センサを得ることができる。アルキレンオキサイドの態様について、権利化するには、一般的に記載する必要があります。本発明において使用するアルキレンオキサイド系ポリマーは、可塑剤としての性質を有し、水に対する溶解速度の速いもの、具体的には、エチレンオキサイド系ポリマー、プロピレンオキサ

イド系ポリマー、例えば第一工業製薬から市販されているパオゲンP P、パオゲンE P等を使用できる。このようなアルキレンオキサイド系のポリマーは試薬層の剥離防止に寄与し、結果的に、測定可能な範囲の確保に寄与する。

【0029】本発明において、上述の電極材料、電子伝達体、リン酸塩および親水性高分子ならびに場合により存在するアルキレンオキサイド系ポリマーは、いずれの好ましい組み合わせを採用することもできる。また、本願発明の改良点である上述の(1)、(2)および

(3)は、単独でも、または、いずれの組み合わせでも用いることができる。特に、目安として考慮するのが好ましい事項は、測定すべき乳酸濃度範囲、電子伝達体の酸化電位もしくは還元電位、電極の組み合わせにより発生する起電力、製造コスト、安定性、反応層の構成成分の組成などであり、これらの組み合わせに応じて、例えばトライ・アンド・エラー法により適当な構成の乳酸センサを作製することができる。

【0030】好ましい乳酸センサの一具体例を以下に示す：

絶縁性基板材料 ポリエチレンテレフタレート
電極材料 グラファイト
親水性高分子層の材料 カルボキシメチルセルロース
(再結晶により精製)
反応層材料組成
乳酸オキシダーゼ： 200～800ユニット/m²
電子伝達体：フェリシアン化カリウム
1. 0～5. 0重量%
リン酸塩：リン酸水素二カリウム
0. 01～1. 00重量%
アルキレンオキサイド系ポリマー：パオゲン
0. 01～1. 00重量%

【0031】本発明の乳酸センサは、上述のように形成したLOD、電子伝達体およびリン酸塩を含む固相化した試薬層の上に、従来の酵素電極に使用されているようにスペーサおよびカバーを有して成ってよい。本発明の乳酸センサの模式的断面図を図1に示す。図1において、乳酸センサ10には、絶縁性基板1上にリード2が設けられ、その上に電極(測定極3および対極4)が配置されている。図示した態様では、全ての電極を覆うように親水性高分子層5およびその上の反応層6から成る試薬層7が配置されている。先に説明したように、試薬層は、電極全体を被覆するのが特に好ましいが、その必要は必ずしもなく、少なくともそれぞれの電極の一部分を被覆すればよい。

【0032】第2の要旨において、本発明は先の第1の要旨のセンサ(例えば乳酸センサ)を製造する方法を提供する。即ち、この製造方法は、絶縁性基板上に測定極および対極から成る電極を形成し、親水性高分子を含んで成る溶液、好ましくは水溶液を電極に適用した後に乾

燥して電極の少なくとも一部分を親水性高分子層により被覆し、オキシダーゼ系酵素(例えば乳酸オキシダーゼ)、電子伝達体およびリン酸塩を含んで成る、反応層を構成する組成物を含んで成る溶液、好ましく水溶液を親水性高分子層に適用した後に乾燥して親水性高分子層少なくとも一部分を反応層により被覆することを特徴とするセンサ(例えば乳酸センサ)の製造方法を提供する。

【0033】本発明の製造方法において、親水性高分子層および反応層を形成する場合、これらの層を構成する成分の溶液、例えば水溶液を調製し、その溶液を電極上に適用し、例えば分注し、その後、溶媒を乾燥除去する。この製造方法において、試薬層を構成する成分の溶液を調製する場合、リン酸塩濃度を0. 01～1. 00重量%、特に0. 10～0. 50重量%とする場合に、特に再現性および感度の良いセンサ(乳酸センサ)を製造することができる。

【0034】また、アルキレンオキサイド系のポリマーが反応層または親水性高分子層、あるいはその両者に含まれる場合、それぞれの層を構成するための溶液は、アルキレンオキサイド系のポリマーを0. 01～1. 00重量%、特に0. 10～0. 50重量%含むのが好ましく、耐剥離性に富む試薬層を形成するのに有効である。更に、そのように形成した試薬層の上に、従来の酵素電極に使用されている上述のようなスペーサおよびカバーを載置してもよく、これらにサンプル吸入口なる開口部を設け、カバー上に適用されたサンプルがこれを通って試薬層および電極に向かって浸透していく。上述の本発明のセンサ(乳酸センサ)に関連して説明した事項は、当て嵌まる事項については、本発明のセンサ(乳酸センサ)の製造方法にも、また、後述する測定器および測定方法についても適用できる。

【0035】第3の要旨において、本発明は上述のセンサ(乳酸センサ)を使用して液体中の酵素により酸化される被測定物質(例えば乳酸)濃度を測定するための測定器を提供する。即ち、サンプル供給検知回路、測定タイミング制御回路、演算回路、表示回路および濃度を表示するための表示部を有して成り、本発明のセンサ(例えば乳酸センサ)を受容(またはこれと係合)し、センサ(例えば乳酸センサ)において成分の濃度に応じて発生する電流値を測定タイミング制御回路が検知できるようにする部材を更に有して成る測定器を提供する。

【0036】本発明において、試料供給検知回路とは、サンプルがセンサ(例えば乳酸センサ)の試薬層に上に設けたカバーおよびスペーサを貫通するサンプル吸引口から供給されて浸透したことによるインピーダンスの変化を検知し、自動的に測定プログラムを起動させる回路である。本発明において、測定タイミング制御回路とは、サンプル供給後、酵素反応が進行し、生成物Pが生成されるのに十分な時間経過後、回路を閉じることによ

つて流れる電流を検出する回路である。

【0037】本発明において、演算回路とは、上記測定タイミング制御回路により検出した電流値を測定器にあらかじめ設定された演算式（検量線）に基づき、被測定物質（例えば乳酸）の濃度に変換する回路である。本発明において、表示回路とは、上記演算回路により変換された濃度値を、測定器の表示部に表示する回路である。

【0038】本発明の測定器の上述の回路は、従来から使用されている酵素電極を使用するものを使用できる。これらの詳細については、例えば特開平4-357452号公報に記載の回路を参照できる。

【0039】第4の要旨において、本発明は、上述のセンサ（例えば乳酸センサ）を測定器に使用して（即ち、電極受容部材に係合させて）被測定物質（例えば乳酸）濃度を測定する方法を提供する。本発明の方法により測定できる被測定物質（例えば乳酸）の濃度は特に限定されるものではなく、測定に使用するサンプル量によっても変わる。測定に使用するサンプル量も特に限定されないが、例えば1.0～5.0μl、特に3.0～5.0μlの量で測定することができる。そのような場合、本発明の方法は、例えば0～200mg/dl、特に2～100mg/dl重量%の範囲の被測定物質（例えば乳酸）の濃度の測定に特に有効である。

【0040】

【作用】本発明のセンサでは、

（1）反応層がリン酸塩を含むことにより、オキシダーゼ系酵素（例えばLOD）の活性の低下が抑制され、被測定物質が高濃度であっても濃度測定が可能となる。従つて、少量のオキシダーゼ系酵素で濃度測定が可能となり、センサ（例えば乳酸センサ）のコストが下がる；

LOD
フェリシアン化カリウム
リン酸水素二カリウム

【0044】（比較例1）従来法としてリン酸水素二カリウムを添加しないで反応層用溶液を調製した以外は、実施例1と同様に乳酸センサを作製した。

LOD 400U/ml
フェリシアン化カリウム 2.0重量%

【0045】（比較例2）従来法として、リン酸水素二カリウムを添加しないで実施例1と同様に乳酸センサを作製した。但し、以下の組成を有する水溶液を用いて試薬層を形成した。

LOD 800U/ml
フェリシアン化カリウム 2.0重量%

【0046】実施例1ならびに比較例1および2のセンサを用いて、血液中の乳酸濃度を測定した結果を、乳酸濃度と反応により生じる電流値とをプロットしたグラフとして図2に示す。測定に際しては、約5μlの血液を使用した。図2から明らかのように、リン酸水素二カリウムを添加した場合、従来法に対して酵素量を半分に減

（2）高分子層に精製した親水性高分子を用いることによりバックグラウンド電流が減少し、センサ（例えば乳酸センサ）の測定精度が向上する；また、

（3）親水性高分子層および/または試薬層がアルキレンオキサイド系のポリマーを含むことにより、剥離が防止され、測定の再現性が向上する；という主たる作用がある。

【0041】

【効果】このような作用の下、本発明により、精度および感度が向上した再現性のあるセンサ（例えば乳酸センサ）が提供される。

【0042】

【実施例】以下に本発明の実施例について詳述する。

尚、実施例においても、先の説明と同様に乳酸センサの作製方法を例として説明するが、本発明は、乳酸センサに特に限定されるものではなく、酵素としてグルコースオキシダーゼを使用すればグルコースセンサ、コレステロールオキシダーゼを使用すればコレステロールセンサを同様に作製することができる。

【0043】（実施例1）ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1上にスクリーン印刷により銀ペーストを印刷し、リード2を形成し、次に、導電性カーボンペーストをリード2上に印刷して測定極3および対極4を印刷した。次に、前記電極上に親水性高分子として、CMC（第一工業製薬からセロゲンという商品名で市販されているもの）の0.5wt%水溶液を分注乾燥させて親水性高分子層5を形成した。つづいて、以下の組成の溶液を分注乾燥して反応層6を形成した。このように作製した乳酸センサの断面図を図1に模式的に示す。

400U/ml
2.0重量%
0.5重量%

らしても同程度の直線範囲が得られることがわかる。即ち、本発明によればLODを減量しても感度が損なわれないため、同じ性能でもコストの安い乳酸センサを作製することができる。

【0047】（実施例2）実施例1の乳酸センサにおいて、CMCを精製したものを用いた他は同じである。CMCの精製には、以下の精製法を用いた。まず、1gのCMCを100mlの水に溶解させる。次にこの溶液にアセトン300mlをガラス棒で攪拌しながら徐々に添加する。直ちに白色の纖維状のCMCが析出するので、それをガラス棒などで引き上げて、50℃で60分間乾燥させる。このようにして作製した乳酸センサを用いて血液を先と同様に測定した時の再現性(CV)を以下の表に示す。

乳酸濃度 (mg/dl)	CV (%)
9.4	6.2
18.6	2.6
53.2	1.6

【0048】(比較例3)市販のCMCを精製せずにそのまま使用した以外は、実施例2を繰り返し、同様に血液中の乳酸濃度を測定した。その結果を以下に示す。

乳酸濃度 (mg/dl)	CV (%)
9.4	12.6
18.6	4.9
53.2	2.3

実施例2および比較例3を比較した場合、CMCを精製すると、再現性が向上し、精度の良い乳酸センサを作製できることがわかる。

【0049】(実施例3)アルキレンオキサイド系の高分子として、第一工業製薬製のパオゲン(登録商標)を0.25重畳%で添加して反応層用の溶液を調製した以外は実施例1を繰り返した。このようにして作製した乳酸センサを用いて血液を先と同様に測定した時の再現性(CV)を以下の表に示す。

乳酸濃度 (mg/dl)	CV (%)
9.4	5.9
18.6	1.9
53.2	1.4

【0050】(比較例4)パオゲンを使用しない以外は、実施例3を繰り返して乳酸センサを作製し、同様に血液中の乳酸濃度を測定した。結果を以下に示す。

乳酸濃度 (mg/dl)	CV (%)
9.4	10.4
18.6	2.6
53.2	2.7

パオゲンを添加するほど、特に低濃度の乳酸でCVが良くなっていることがわかる。これは、パオゲンにより試薬層の剥離が抑制された結果であると考えられる。

【図面の簡単な説明】

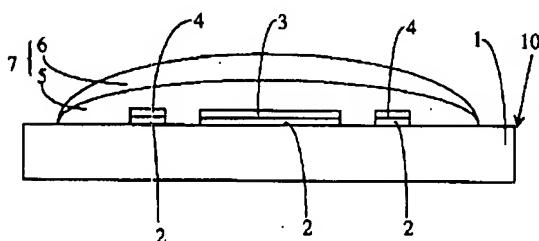
【図1】図1は、本発明の乳酸センサの断面を模式的に示す図である。

【図2】実施例1のセンサの乳酸に対する応答を示すグラフである。

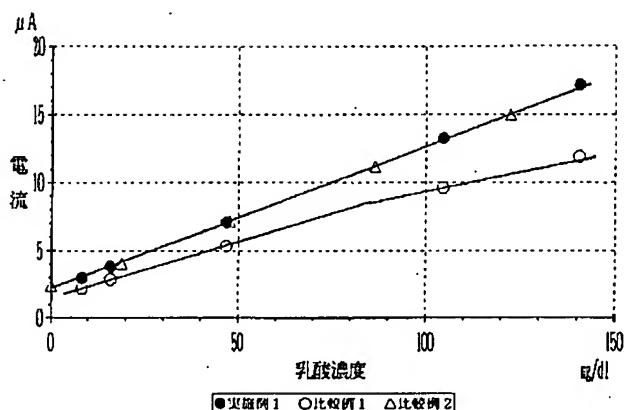
【符号の説明】

1…基板、2…リード、3…測定極、4…対極、5…親水性高分子層、6…反応層、7…試薬層、10…乳酸センサ。

【図1】



【図2】



【手続補正書】

【提出日】平成7年4月21日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正内容】

【0028】更に、本発明の乳酸センサにおいて、反応層を構成する成分にエステル結合が主体のポリマー、特にアルキレンオキサイド系のポリマーであって、アルキレンオキサイド（例えばエチレンオキサイド、プロピレンオキサイド、スチレンオキサイド、ブチレンオキサイドなど）の付加重合体が、多価カルボン酸（例えばマロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、フタル酸、テトラベンゼンカルボン酸など）またはその誘導体（例え

ば無水コハク酸、無水マレイン酸などの無水物あるいは、フタル酸ジメチル、マレイン酸ジメチルなどの低級アルキルエステルなど）とエステル化反応もしくはエステル交換反応することによりポリマーとなったものであり、分子量が2万～30万であるポリマーを更に加えると、再現性の良い乳酸センサを得ることができる。本発明において使用するアルキレンオキサイド系ポリマーは、可塑剤としての性質を有し、水に対する溶解速度の速いもの、具体的には、エチレンオキサイド系ポリマー、プロピレンオキサイド系ポリマー、例えば第一工業製薬から市販されているパオゲンP P、パオゲンE P等を使用できる。このようなアルキレンオキサイド系のポリマーは試薬層の剥離防止に寄与し、結果的に、測定可能な範囲の確保に寄与する。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

G 01 N 27/30

3 5 3 J

27/46

3 3 6 H